

京都大学	博士（医学）	氏 名	高井 健
論文題目	A Potential Link between Alternative Splicing of the NBS1 Gene and the DNA Damage/Environmental Stress (NBS1 遺伝子の選択的スプライシングと DNA 損傷／環境ストレスとの関連性)		
(論文内容の要旨)			
Nijmegen breakage syndrome (NBS) は、放射線高感受性、免疫低下、高発がん性等を特徴とする常染色体劣性遺伝病で、NBS1 遺伝子の突然変異によって引き起こされる。NBS1 は、MRE11、RAD50 と複合体を形成し、DNA 二重鎖切断の相同組換え修復に関わる。しかし、NBS1 の発現を制御するメカニズムはわかっていない。 NBS1 のクローニングの過程で、以前に報告された wild-type form に加えて選択的スプライシングを受けた variant form が転写されていることを見出した。この splice variant は wild type のエクソン 2、3 の間のイントロン 2 に存在する 50 bp の配列 (putative exon) を含んでおり終止コドンが存在していた。RT-PCR で解析したところ、殆どの組織では wild-type form の発現が優位なのに対して末梢血単核球では splice variant が優位であった。しかし、末梢血単核球における splice variant 転写産物の割合には個人差があり wild type 優位の者も存在した。 Splice variant が蛋白を産生するか確認するため、NBS 患者由来線維芽細胞に splice variant NBS1 発現ベクターを導入して免疫ブロットを行ったが、タンパク質は確認できなかった。splice variant は相同組換え能を認めなかったことからタンパク質を産生しないと考えられた。 休止期リンパ球に X 線を照射し、NBS1 遺伝子の発現の変化を解析した。ノーザンブロット法では、照射から 3～6 時間後に NBS1 の転写レベルが最大となり、その後低下を認めた。RT-PCR 産物を用いて wild type、splice variant の比率を解析したところ、NBS1 の splice variant が急速に減少する一方で、wild type の転写は増加し、6 時間後には wild type のみ発現されていた。X 線照射後 NBS1 蛋白レベルも増加し、3～6 時間後に最大となった。マイトージェンやアルキル化剤で処理を行った時も同様に wild type 優位へと変化した。Splice variant 優位の休止期リンパ球に比べて、wild type 優位の増殖刺激 6 時間後のリンパ球では、放射線に対する感受性が低下していたが、刺激 72 時間後には splice variant が再び優位となり放射線感受性が上昇した。この結果から放射線や増殖刺激によって誘導されるスプライシングの変化が NBS1 蛋白量の変化と放射線感受性に関連していることが示唆された。 ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マウス、ラットで putative exon 及びその周辺の塩基配列を比較すると前三者で類似しておりアカゲザルでは splice variant の存在が報告されていた。マウス、ラットでは putative exon の下流イントロンの 5'スプライス部位にコンセンサス配列を認めず脾細胞を使った RT-PCR でマウスには splice variant 転写産物が存在しないことを確認した。従って NBS1 のスプライシング機構は哺乳類の進化の過程で獲得された可能性がある。 以上の結果は、DNA 損傷や増殖刺激により NBS1 がスプライシングパターンの変化を起こし、NBS1 蛋白の発現を調節しており、放射線感受性にも関連していることを示している。休止期リンパ球は例外的に放射線感受性が高いことが知られており、NBS1 のスプライシングが関連している可能性があると考えられた。			

（論文審査の結果の要旨） NBS1はMRE11、RAD50と複合体を形成しDNA二重鎖切斷の相同組換え修復に関わる。本論文ではNBS1の発現制御メカニズムを解析した。 <i>NBS1</i>のクローニングの過程でsplice variant fbrm を見出した。このsplice variantはwild typeのエクソン2、3の間に50bpの putative exonを含んでおり終止コドンが存在していた。発現を解析したところ殆どの組織ではwild-type formの発現が優位なのに対して休止期リンパ球ではsplice variantが優位であった。Splice variantはタンパク質を産生しなかった。 休止期リンパ球にX線照射したところ3～6時間後に<i>NBS1</i>の転写レベルが最大となりsplice variantが減少しwild type優位へと変化した。NBS1蛋白量も3～6時間後に最大となった。マイトージェンやアルキル化剤で処理した時も同様に wild type優位へと変化した。リンパ球の放射線感受性は、splice variant優位の休止期に比べて増殖刺激後6時間のwild type優位な状態で低下していたが、splice variant優位の刺激72時間後には再び上昇した。スプランシングによるNBS1発現量変化と放射線感受性との関係が認められた。 以上の研究は、休止期リンパ球の放射線高感受性メカニズムの解明に寄与する可能性がある。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成20年4月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			